

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協定条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C07C 229/16, C12N 15/00, A61K 48/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/46235</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年9月16日(16.09.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/01146  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年3月10日(10.03.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/58614 1998年3月10日(10.03.98) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒541-8514 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 Osaka, (JP) <b>(71) 出願人 ; および</b> <b>(72) 発明者</b> 中村栄一(NAKAMURA, Eiichi)(JP/JP) 〒113-0021 東京都文京区本駒込5-3-3-1001 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 澤村正也(SAWAMURA, Masaya)(JP/JP) 〒113-0021 東京都文京区本駒込4-38-1-202 Tokyo, (JP) 磯部寛之(ISOBE, Hiroyuki)(JP/JP) 〒113-0033 東京都文京区本郷4-12-13-203 Tokyo, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 関 英男(SEKI, Hideo) 〒532-8514 大阪府大阪市淀川区加島2丁目1番6号 藤沢薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54)Title: FULLERENE DERIVATIVES</b>  <b>(54)発明の名称</b> フラーレン誘導体  <b>(57) Abstract</b> A novel means for condensing DNA. Fullerene derivatives having 1 to 4 nitrogen-containing hydrophilic side chains or salts thereof to be used in the above means. The means makes it possible to effectively condense and is expected to be applicable to gene therapy, etc.		

## (57)要約

新たなDNA凝縮のための手段を提供する。

DNA凝縮を目的として使用される、1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類を提供することで、上記課題の解決を図る。

効果的にDNA凝縮を行うことができ、遺伝子治療等への応用も期待される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SI	スロバニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TR	トルコ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CJ	コートジボアール	IL	イスラエル	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク						

## 明 細 書

フラーレン誘導体

## 5 技術分野

本発明は、DNAの凝縮能力を有し、例えば、DNA凝縮試薬として有用なフラーレン (fullerene) 誘導体に関するものであり、例えば、医薬品産業の分野で有用である。

## 10 背景技術

染色体上でのDNAの配列で例示されるようなタンパク-DNA複合体におけるDNAの凝縮 (compaction) は極めて重要な生物化学的課題である。有機小分子や無機イオンによる凝縮もトランスフェクション (transfection) に関連して重要な研究課題である (例えば、Yoshikawa, Y. et al, FEBS Letters, 1996, vol. 396, 71-76; Behr, J-P, Acc. Chem. Res., 1993, vol. 26, 274-278; 等を参照)。

本発明は、新たなDNA凝縮のための手段を提供せんとするものである。

## 20

## 発明の開示

現在までにフラーレンをその目的に応じて種々化学的に修飾する方法が提供

され、種々のフラーレン誘導体が合成されて来た (例えば、Friedman, S. H. et al, J. Am. Chem. Soc., 1993, vol. 115, 6506-6509; Yamago,

S. et al, J. Am. Chem. Soc., 1994, vol. 116, 1123; Taki, M. et al, J. Am. Chem. Soc., 1997, vol. 119, 926; An, Y. Z. et al, Tetrahedron, 1996, vol. 52, 5179-5189; Nakamura, E. et al, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1996, vol. 69, 2143-2151; Yamago, S. et al, 5 Chemistry Letters, 1996, 395-396; Murata, Y. et al, The 2nd International Forum on Chemistry of Functional Organic Chemicals (IFOC-2), 1997, P-31, Tokyo, Japan, 等を参照)。

本発明者らは、かかるフラーレン誘導体の内、1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類が、両  
10 親媒性で極めて優れたDNAの凝縮能力を有することを見出し本発明を完成した。

#### 1. 本発明のフラーレン誘導体の構造

本発明のフラーレン誘導体は、「1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体」である。このフラーレン誘導体には、新規な化合物ならびに公知の化合物の両者が含まれる。  
15

本発明のフラーレン誘導体のDNAの凝縮能力は、フラーレンの大きさ、疎水性と、含窒素親水性側鎖のリン酸基への親和性との共同的作用によるものである。フラーレンがDNAの疎水性部分（例えば、DNAの主溝）と、含窒素親水性側鎖がDNAのリン酸基と  
20 それぞれ相互作用することによりDNA単分子が折り畳まれ、さらには、多数のこの折り畳まれたDNA単分子の疎水性部分が集合することで、かかる凝縮が生じるものと考えられる。

従って、フラーレン誘導体の分子設計はこの点を考慮して当業者であれば適宜為し得るものである。合成されたフラーレン誘導体の  
25 DNAの凝縮能力は、フラーレン誘導体とDNA（例えば、プラス

ミドDNA)の混合溶液を電気泳動し、泳動されるDNAの量を蛍光発光写真により測定することで評価し得る。また、この凝縮作用はフラーレン誘導体がDNAに対し高い結合能力を持つことと深くかかわるため、例えば、牛胸腺DNAへのエチジウム ブロミドとの競合結合実験によりスクリーニングすることが可能である。

フラーレン誘導体は、その塩類の形で用いることもできるが、この場合の塩類としては、慣用の無毒性の塩であって、とりわけ医薬として許容される塩が好ましい。具体的には、無機酸付加塩（例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、等）、有機カルボン酸またはスルホン酸付加塩（例えば、蟻酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、等）、塩基性または酸性アミノ酸（例えば、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、等）との塩を挙げることができる。

フラーレン誘導体には不斉炭素原子の存在や分子不斉の存在により、種々の異性体が存在し得るが、そのいずれも本発明のフラーレン誘導体に含まれる。

本発明のフラーレン誘導体における「フラーレン」には、C<sub>60</sub>フラーレンのみならず、高次フラーレン（例えば、C<sub>70</sub>フラーレン、等）も含まれる。

好適な「含窒素親水性側鎖」としては、「窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなる基を1または2個その置換分として有し、フラーレン上に存在する2ないし8個の内の1または2個のsp<sup>3</sup>炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」が挙げられ、より

好ましくは「窒素原子を 2 ないし 8 個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の炭素数 2 ないし 20 個からなる基を 1 または 2 個その置換分として有し、フラーレン上に存在する 2 ないし 8 個の内の 2 個の  $sp^3$  炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」が挙げられる。

当該「含窒素親水性側鎖」におけるアミノ基は、1 級、2 級または 3 級アミノ基のいずれでもよく、窒素原子を含む複素環〔例えば、窒素原子 1 ないし 4 個を有する 3 ないし 8 員（好ましくは、5 または 6 員）の不飽和複素単環基（例えば、ピロリル、ピロリニル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ジヒドロピリジル、ピリミジル、ピラジニル、ピリダジニル、トリアゾリル、テトラゾリル、等）；窒素原子 1 ないし 4 個を含む不飽和縮合複素環基（例えば、インドリル、イソインドリル、インドリジニル、ベンズイミダゾリル、キノリル、イソキノリル、インダゾリル、ベンゾトリアゾリル、アクリジニル、等）等〕を形成していてもよい。また、必要により低級アルキル基等により置換されていてもよい。

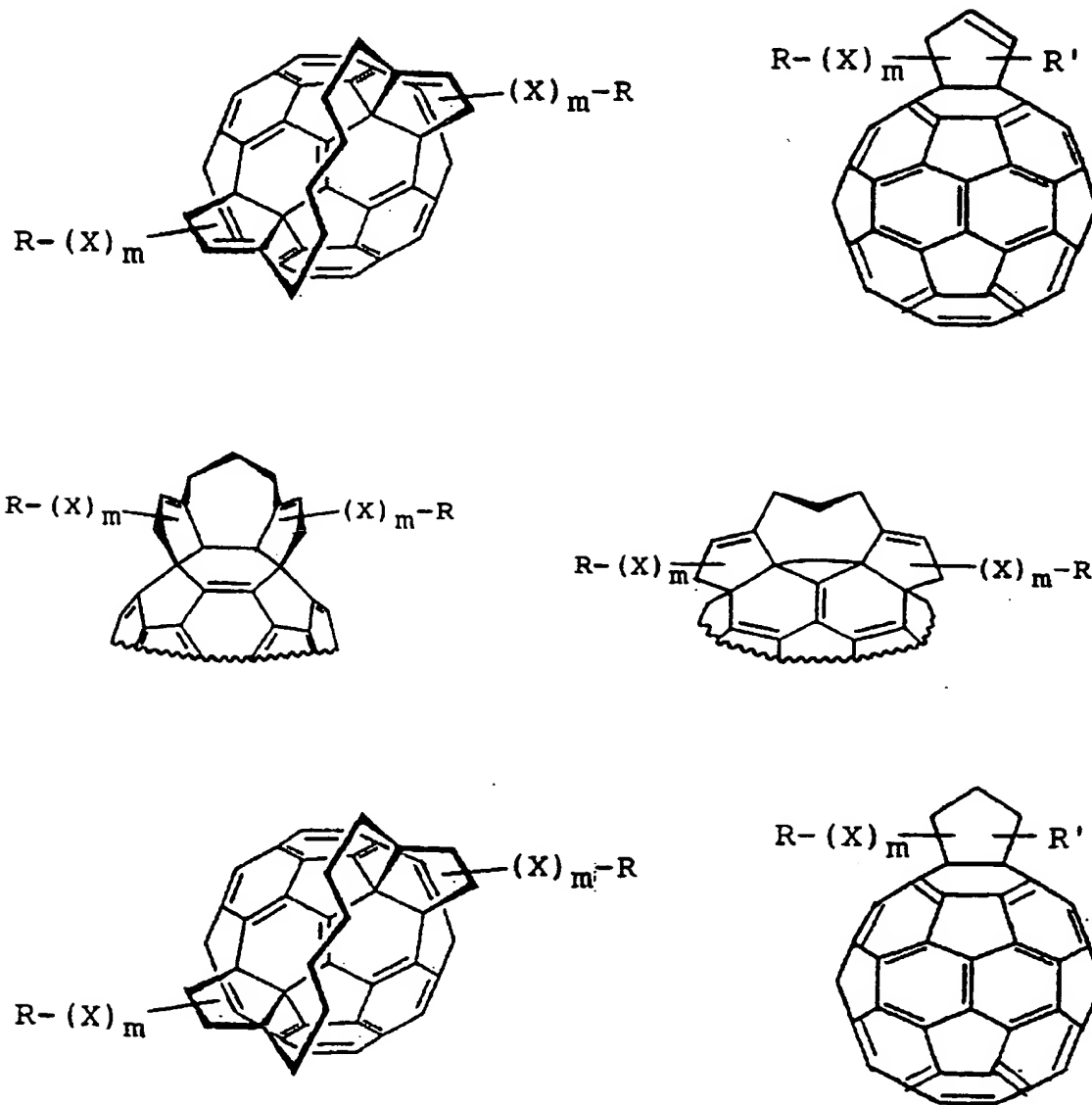
なお、当該「含窒素親水性側鎖」は酸素原子、イオウ原子等の他のヘテロ原子を、その構成原子として、および／または、その置換分として、有していてもよい。

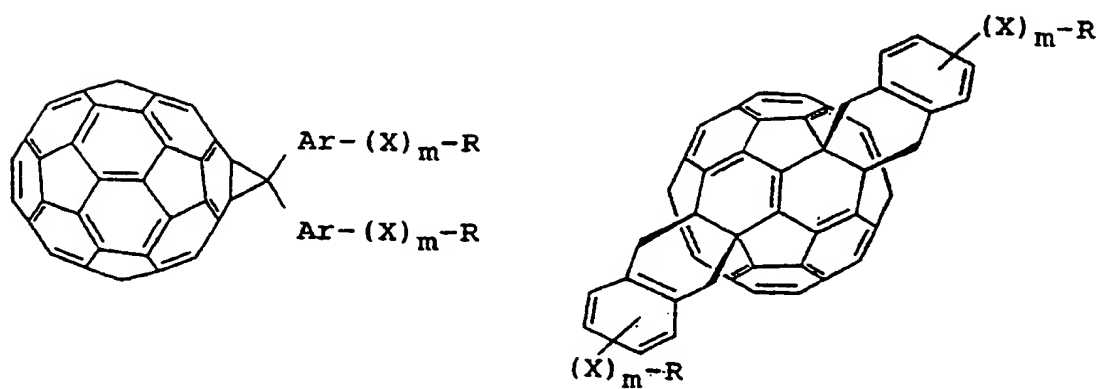
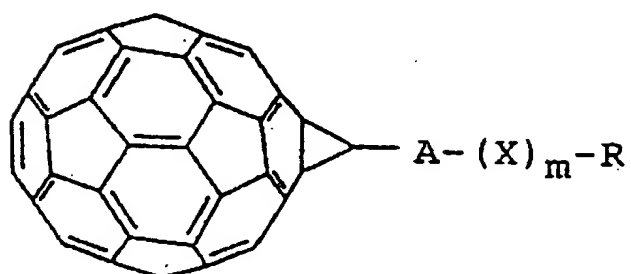
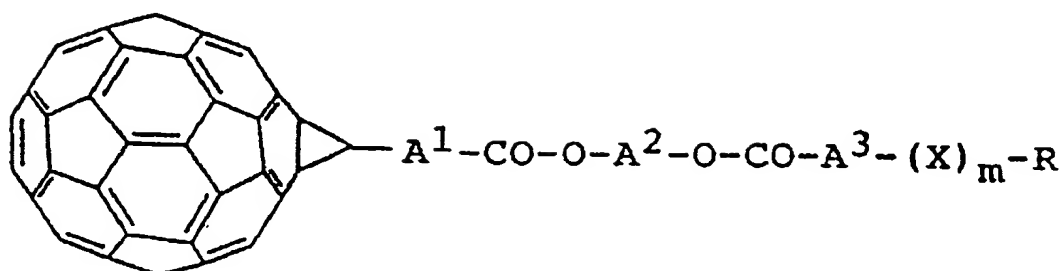
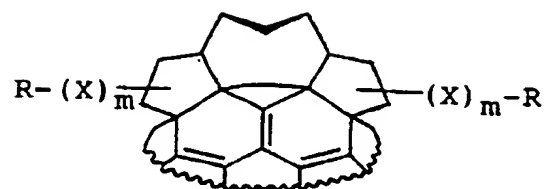
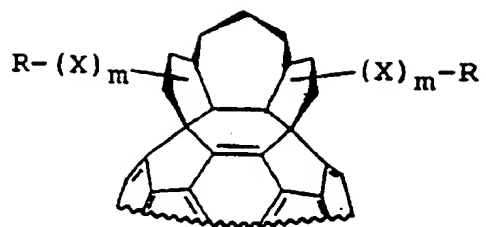
さらには、2 以上の「含窒素親水性側鎖」がある場合には、各「含窒素親水性側鎖」間を繋ぐアルキレン基からなる架橋部位があってもよい。

「含窒素親水性側鎖」における「炭化水素基」には、飽和または不飽和の、直鎖状、分岐状または環状の炭化水素基が含まれ、好ましいものは、炭素数 1 ないし 20 個（より好ましくは 1 ないし 15

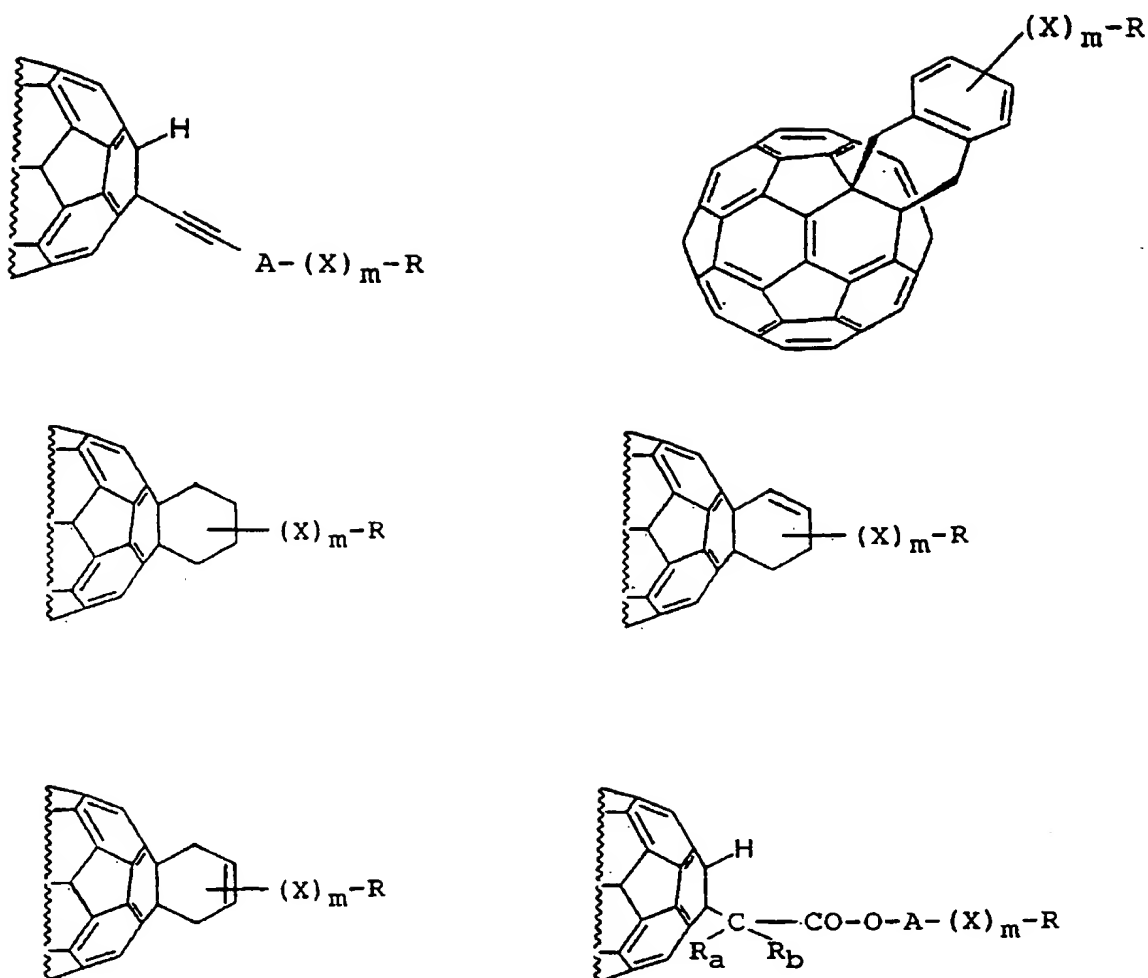
個) を有する炭化水素基である。

当該「含窒素親水性側鎖」の具体的構造としては、以下のようなものが例示される（フラーレン部分も示されている）。





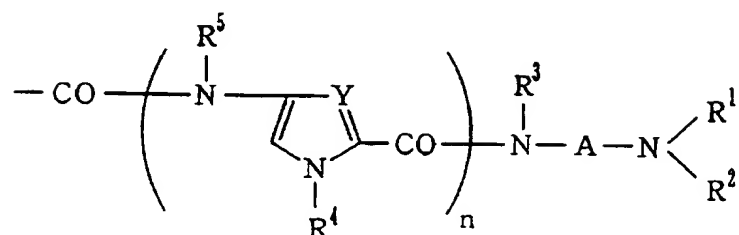




- 上記式中、Rは、同一または異なって、窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアシル基〔より好ましくは、〔N-（N，N-ジ（低級）アルキルアミノ）（低級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（低級）アルカノイル基、〔N-（N-（低級）アルキルアミノ）（低級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（低級）アルカノイル基、〔N-ピロリル（低級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（低級）アルカノイル基、〔N-（N，N-ジ（低級）アルキルアミノ）（高級）アルキル-N-（低級）

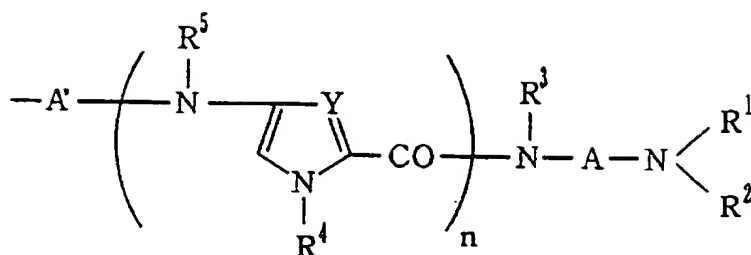
アルキル] アミノ (低級) アルカノイル基、[N-(N-(低級) アルキルアミノ) (低級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (高級) アルカノイル基、[N-ピロリル (高級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (高級) アルカノイル基、または、式

5 :



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ および $\text{R}^5$ は、同一または異なって、水素または低級アルキル基、Aはアルキレン基、YはCHまたはN、およびnは1ないし4の整数を意味する) で示される基等が挙げられる。]、または、窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアルキル基 [より好ましくは、[N-(N,N-ジ(低級) アルキルアミノ) (低級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (低級) アルキル基、[N-(N-(低級) アルキルアミノ) (低級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (低級) アルキル基、[N-ピロリル (低級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (低級) アルキル基、[N-(N,N-ジ(低級) アルキルアミノ) (高級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (低級) アルキル基、[N-(N-(低級) アルキルアミノ) (低級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (高級) アルキル基、[N-ピロリル (高級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (高級) ア

ルキル基)、または、式:



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $A$ 、 $Y$ および $n$ はそれぞれ前と同じ意味であり、 $A'$ はアルキレン基を意味する)で示される基等  
5 が挙げられる。]

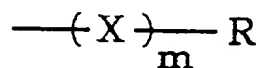
Arはアリール基（例えば、フェニル、ナフチル、アントリル、等）、

R' は、水素または低級 アルキル基、

10 RaとRbとは、同一または異なって、水素または低級アルキル基を意味するか、もしくは、両者は一体となって、結合する炭素原子とともに3ないし6員のシクロアルキル基を形成してもよい基、

A、A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>およびA<sup>3</sup>は、同一または異なって、アルキレン基、Xは-O-、-N-または-S-、および、mは0または1の整数をそれぞれ意味する。

15 但し、以上の「含窒素親水性側鎖」はあくまでも一例であり、「  
フラーレン」と「式



で示される基」とではさまれた部分の構造としては、上記以外の公知の構造を採用することもできる。

ここで、「低級アルキル基」または「低級アルキル部分」としては、炭素原子 1 ないし 6 個を有する直鎖または分岐状のもの、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、第 2 級ブチル、第 3 級ブチル、ペンチル、イソペンチル、第 3 級ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、等を挙げる  
5 ことができる。

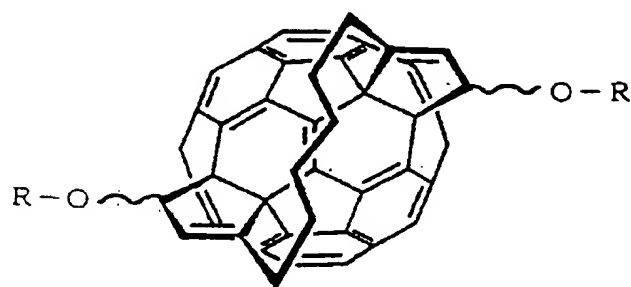
「アルキレン基」としては、炭素数 1 から 10 個を有する直鎖または分岐状のもの、例えば、メチレン、エチレン、トリメチレン、2-メチルトリメチレン、テトラメチレン、エチルエチレン、ペン  
10 タメチレン、3-メチルペンタメチレン、ヘキサメチレン、2-エチルテトラメチレン、ヘプタメチレン、オクタメチレン、ノナメチレン、デカメチレン、等を挙げることもできる。

また、「高級アルキル基」または「高級アルキル部分」としては、炭素原子 7 ないし 20 個を有する直鎖または分岐状のもの、例えば、  
15 ヘプチル、オクチル、2-エチルヘキシル、ノニル、デシル、3,7-ジメチルオクチル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、3-メチル-10-エチルドデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシル、等を挙げることもできる。

20 フラーレン上の「含窒素親水性側鎖」の数は、1 ないし 4 本が好適であるが、1 本鎖または 2 本鎖の場合が特に好ましい。1 本鎖の場合は比較的含窒素数の多いもの（好ましくは窒素数 4 個以上）を有するものを選ぶのが有利であり、とりわけ、比較的高い結合能を持つポリピロール類が好ましい。また、側鎖が 2 本ある場合は、  
25 窒素原子数 2 ないし 8 個の比較的親水性が低いアルキルポリアミン

が好ましい。

以上説明されたフラーレン誘導体の中で好ましいものは、合成上の容易さやそのDNAへの結合能力の強さ等の諸要素で適宜選択されるものであるが、現在までの知見で好ましいものとしては、以下の一般式(I)で示されるものが挙げられる。

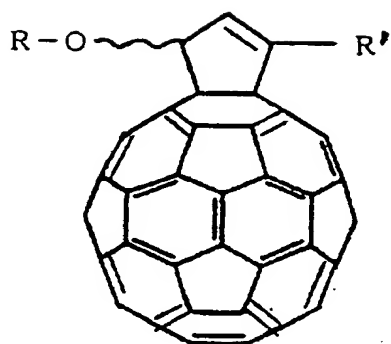


[式中、2つのRは、同一または異なって、窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアシル基または水素をそれぞれ意味する(但し、2つのRは同時には水素ではない)] またはその塩類。

より好ましいフラーレン誘導体としては、2つのRが、同一または異なって、窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアシル基である一般式(I)の化合物が挙げられる。

さらに好ましいフラーレン誘導体としては、2つのRが、同一または異なって、窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし20個からなるアシル基である一般式(I)の化合物が挙げられる。

さらに、以下の一般式(II)：



〔式中、Rは窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアシル基、および、R'は水素または低級アルキル基をそれぞれ意味する〕

で示されるフラーレン誘導体またはその塩類も別の好ましいフラーレン誘導体として挙げられる。

より好ましいフラーレン誘導体としては、Rが、窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアシル基である一般式（I I）の化合物が挙げられる。

さらに好ましいフラーレン誘導体としては、Rが窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし20個からなるアシル基である一般式（I I）の化合物が挙げられる。

## 2. 本発明のフラーレン誘導体の製造法

本発明の上記フラーレン誘導体またはその塩類は、その構造に応じて、当技術分野で公知の合成法またはそれを適宜変更して用いて合成することができる（上記ならびに後記の諸文献参照）。

以下、「含窒素親水性側鎖」を1本または2本有するフラーレン誘導体を例にとり、より具体的に本発明のフラーレン誘導体の製造法につき説明する。

製造法 A (側鎖 1 本)

- 5      シクロプロペノンアセタールから熱的に発生するビニルカルベン活性種とフラーレンとの文献既知の反応 (文献 1. Tokuyama, H.; Isobe, H.; Nakamura, E., Bull. Chem. Soc. Jpn. 1995, vol. 68, 935-941) から得られる有機フラーレン (メタノフラーレン、プロパノフラーレン) の官能基変換により含窒素側鎖を導入することで
- 10   合成される。メタノフラーレンはビニルカルベン活性種の反応後、水を加えることでケテンアセタールが加水分解され、プロパノフラーレンは水/テトラヒドロフラン/クロロベンゼン中での硫酸触媒でのアセタールの加水分解による除去、続くジイソブチルアルミニウムハイドライドによる還元後、それぞれ水酸基を持った有機フラーレンへと変換される。得られた水酸基に対し以下の官能基変換を行
- 15   うと目的のフラーレン誘導体を合成できる。
- 1   文献既知の反応 (文献 2. Nakamura, E.; Tokuyama, H.; Yamago, S.; Shiraki, T.; Sugiura, Y., Bull. Chem. Soc. Jpn. 1996, vol. 69, 2143-2151) である、無水こはく酸と水酸基を持つ有機フラーレンとのカップリング反応により、カルボン酸誘導体を得る。この得られたカルボン酸と、1級あるいは2
- 20   級アミンを持つアミン化合物とのカップリングを行うことで目的の生成物を得
- 25   る。

ここで、アミン化合物としては、例えば、文献2に記載のあるネ  
トロプシン誘導体を導入したものと類似のポリピロール誘導体、あ  
るいは、アルキルスぺルミジン等のポリアミン類、さらには、D N  
A塩基対間にインターカレート可能なアクリジン等を用いることが  
5 できる。

2.  $\alpha$ -ハロ酸ハライドと水酸基を持つ有機フラーレンとをカップ  
リングさせ(文献3. Boutorine, A.S.; Tokuyama, H.; Takasugi, M.;  
Isobe, H.; Nakamura, E.; Helene, C., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*,  
1994, vol. 33, 2462-2465; 文献4. An, Y.Z.; Chen, C.H.B.;  
10 Anderson, J.L. Sigman; D.S. Foote, C.S.; Rubin, Y., *Tetrahedron*,  
1996, vol. 52, 5179-5189)、 $\alpha$ -ハロカルボニル化合物を得る。  
この得られたハライドと先と同様の1級あるいは2級アミンを持つ  
アミン化合物とのカップリングを行うことで目的の生成物を得る。

ここで、アミン化合物としては、前記のものを用いることができ  
15 る。

これらの手法は文献既知の水酸基を持つフラーレン誘導体(上記  
文献4.; 文献5. Tokuyama, H.; Yamago, S.; Nakamura, E.; Shiraki,  
T.; Sugiura, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, 7918-7919  
)について共通に応用可能である。

## 20 製造法B(側鎖2本)

上述の製造法Aの手法に併せ、ビスシクロプロペノンアセタール  
とフラーレンとの文献既知の反応(文献6. Isobe, H.; Tokuyama,  
H.; Sawamura, M.; Nakamura, E., *J. Org. Chem.*, 1997, vol. 62,  
5034-5041)から得られる有機フラーレン(ビスプロパノフラーレ  
25 ン)の官能基変換により親水性残基の導入を行うことで、さらに効



果的なDNA凝縮能を持つフラーレン誘導体が合成される。官能基変換は先と同様に、ビスプロパノフラーレンを水／テトラヒドロフラン／クロロベンゼン中での硫酸触媒でのアセタールの加水分解による除去、続くジイソブチルアルミニウムヒドライドによる還元  
5 後、二つの水酸基を持った有機フラーレンへと変換される。この時、立体異性体を含め、8種の異性体の混合物が得られるが、混合物について前述と同様の官能基変換を行うことで目的のフラーレン誘導体を合成できる。

1. 無水こはく酸と水酸基を持つ有機フラーレンとをカップリング  
10 グさせ、カルボン酸誘導体を得る。この得られたカルボン酸と1級あるいは2級アミンを持つアミン化合物とのカップリングを行うことで目的の生成物を得る。

アミン化合物としては、前記のものを用いることができる。

2.  $\alpha$ -ハロ酸ハライドと二つの水酸基を持つ有機フラーレンとを  
15 カップリングさせ、 $\alpha$ -ハロカルボニル化合物を得る。この時、用いる $\alpha$ -ハロ酸ハライドとしては $\alpha$ -ブromoアセチルブロミドが知られているが、ハライドとしてはクロリドおよびブロミド共に適用可能であり、さらに $\alpha$ 位に置換基を持つものでも可能である。有機フラーレンとしてはC<sub>2</sub>対称性を持つ誘導体について報告があるが  
20 (文献7. Isobe, H.; Sawamura, M.; Nakamura, E., 13th Fullerene Symposium, 1997, 2-20, Nagano, Japan)、上記文献6に記載された対称性の異なる有機フラーレンを、あるいは、ジイソブチルアルミニウムヒドライド還元で得られる異性体の混合物を用いることで同等あるいはそれ以上の活性が得られる。得られたハライドと、  
25 先と同様の1級あるいは2級アミンを持つアミン化合物とのカップ

リングを行うことで目的の生成物を得る。

ここで、アミン化合物としては、前記のものを用いることができる。

これらの手法は文献既知の複数の水酸基を持つフラーレン誘導体（  
5 文献 8. Taki, M.; Sugita, S.; Nakamura, Y.; Kasashima, E.;  
Yashima, E.; Okamoto, Y.; Nishimura, J., J. Am. Chem. Soc., 1997,  
vol. 119, 926）について共通に応用可能である。

当業者であれば、本明細書に引用された諸文献の開示、その他の  
公知技術、ならびに製造法 A および B に関する具体的開示もしくは  
10 後述の実施例を参酌して、所望の構造を有する本発明のフラーレン  
誘導体を製造することができる。

### 3. 本発明のフラーレン誘導体の使用態様

本発明のフラーレン誘導体は、両親媒性の化合物であり、優れた  
DNA の凝縮能力を有している。本発明のフラーレン誘導体を、D  
15 NA に作用させると、その DNA への結合能力に基づき、DNA は  
分子内の 2 重鎖間の結合作用により、単分子 DNA は曲げられ折り  
畳まれる。さらに分子間での結合作用により DNA 凝縮体を生成す  
る。この凝縮体形成はフラーレン誘導体の濃度に関して可逆的であ  
り、フラーレン誘導体を抽出して除くと DNA が再生する。

20 このことは、プラスミド pBR322 に対して種々の濃度で後記  
の「テトラアミン化合物」を作用させたサンプルを、アガロース電  
気泳動実験ならびに AFM 顕微鏡による形態観察に付すことで確認  
されている。以下、この点につき具体的な試験データにより説明す  
る。

### 25 試験化合物

後記の実施例 1 で得られたフラーレン誘導体（以下、「テトラアミン化合物」という）を試験に供した。

#### 電気泳動実験方法

電気泳動は、Short Protocols in Molecular Biology 3rd Ed., 1992,  
5 Wiley, 2-13に記載の方法に従った。

試験サンプルとしては、プラスミド p B R 3 2 2 (25  $\mu$ g/mL) と「テトラアミン化合物」の所定量を 20% THF/HEPES-Mg 緩衝液 (20  $\mu$ L) に溶解したものを用いた。このサンプルを 25℃で 5 分間インキュベートした後、0.25% (w/v)  
10 ) ブロモフェノール ブルーおよび 50% (v/v) グリセロールを含む緩衝液 (5  $\mu$ L) でアガロースゲル上に展開した。電気泳動は、エチジウム ブロミド (0.5 mg/mL) を含む 1% (w/v) アガロースゲルの TBE 緩衝液中溶液を用いて行った。蛍光発光写真の IOD (integrated optical density)  
15 s i t y) は、NIH イメージ プログラム v1.60 により測定した。これにより、泳動された DNA の量を測定した。

#### 実験結果

詳細は図 1 に示す。

「テトラアミン化合物」の濃度依存性で、相転移現象が起こった。  
20 即ち、アガロース電気泳動により泳動される DNA は、DNA のベースペア数に対するフラーレン誘導体分子数比が 1/1 で急速に減少し、1/2.6 で完全になくなった。

電気泳動に用いたサンプルの水薄膜中での AMF 顕微鏡での観察でも、相転移の前後で全く異なる AMF 像が見られた。相転移前から、DNA の凝縮が始まり、相転移後は多分子凝縮体は疎水性の集  
25

合体となっていることが確認された。

以上の実験結果からは、完全なDNA凝縮体を形成するためには、DNAのベースペア数に対するフラーレン誘導体分子数比が、4 : 1 から 1 : 2 の範囲であることが望ましいと考えられる。

5      なお、ここでの、フラーレン誘導体によるDNA凝縮体の形成は、例えば、適当な緩衝液中で両者を混合することで行われるが、これに限定されず当技術分野で通常用いられる方法により行うことができる。また、相転移したDNA溶液をエタノール沈殿処理等の常法により処理することで、DNA凝縮体を単離することもできる。さらに、フラーレン誘導体の添加により凝縮を起こしたDNA溶液から、クロロホルム等の有機溶媒でフラーレン誘導体を抽出することで、もとのDNAを再生することもできる。

10      前述のように、フラーレン誘導体のDNA凝縮能力は、DNAに対する高い結合能力と深くかかわっている。参考までに、前記「テトラアミン化合物」に関する試験結果を示す。

#### 試験方法

DNAの凝縮能力は、仔ウシ胸腺DNAへのエチジウム ブロミドとの競合結合実験により評価された。この競合結合実験の方法は、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー、21巻、658  
20      - 668頁（1978年）に記載されたものを用いた。

#### 試験結果

「テトラアミン化合物」は1.9  $\mu$ Mの濃度でエチジウム ブロミドの50%置換を起こした。

25      なお、この試験結果は、本発明を実施する上で特に好ましいフラーレン誘導体の分子設計を行う際の目安となるものであり、適宜合

成されたフラーレン誘導体のDNAへの結合能力が上記の化合物と同等もしくはそれ以上のものが本発明を実施する上でとりわけ望ましいと考えられる。

- 本発明のフラーレン誘導体のDNA凝縮の機構を検討するため、
- 5 以下の2つの実験を行った。

#### 試験方法

##### CDスペクトル測定.

- 仔ウシ胸腺DNA (average MW = 8.6 MDa, 13 kbp, 42% GC, highly polymerized, type 1, Sigma) あるいはプラスミド pBR322 DNA (MW = 2.83 MDa, 4361 bp, New England Biolabs) の塩基対濃度 100 mM
- 10 の HEPES-Mg 緩衝溶液 40 mM HEPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; pH = 7.6) を調整し、石英硝子セル中に入れ、25℃において JASCO J-720 スペクトルメーターにより CD スペクトルを測定した。さらに、この溶液に対し、核酸凝縮性フラーレンを薬物濃度 10~200 mM となるように
- 15 加え、その CD スペクトルを測定した。

#### 試験結果

DNA の配座に由来する CD スペクトルに全く変化は起こらず、DNA が B 型配座を保持していることが明かとなった。

#### 試験方法

- 20 DNA 解離温度 (T<sub>m</sub>) 測定

仔ウシ胸腺 DNA (average MW = 8.6 MDa, 13 kbp, 42% GC, highly polymerized, type 1, Sigma) の塩基対濃度 100 mM の HEPES-Mg 緩衝溶液 40 mM HEPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; pH = 7.6) を調整し、核酸凝縮性フラーレンを薬物濃度 10 mM となるように加えた。

- 25 この溶液を石英硝子セルに入れ、60℃から 1℃/分の速度で昇温し、

その間 JASCO J-720 スペクトルメーターにより、DNA 二重鎖に由来する淡色効果が見られる 258 nm における吸光度を定点測定した。

#### 試験結果

二重鎖の解離温度が核酸凝縮性フラーレンを加えない場合  
5 (71.5 °C) に比べ 2.7°C 上昇し (74.2°C)、二重鎖構造が安定化されていることが明かとなった。

以上の実験結果から、核酸凝縮性フラーレンが DNA の疎水性部分（例えば、DNA の主溝）と、含窒素親水性側鎖が DNA のリン  
10 酸基とそれぞれ相互作用することにより DNA 単分子が折り畳まれ、さらには、多数のこの折り畳まれた DNA 単分子の疎水性部分が集合することで、かかる凝縮が生じるとのメカニズムが強く示唆された。

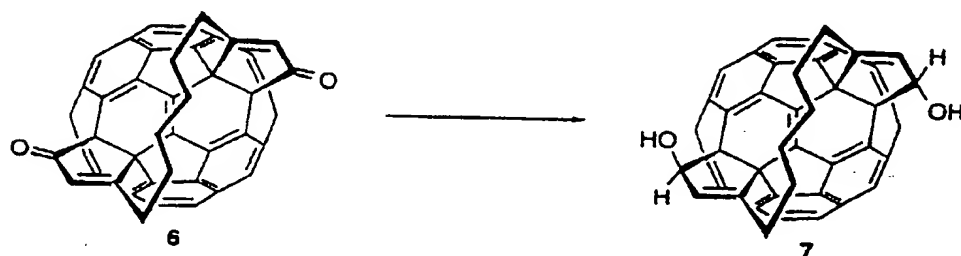
本発明のフラーレン誘導体が、単に DNA への結合能力を有するのみでなく、さらに進んで多分子の DNA を凝縮させる能力を有す  
15 るとの知見は全く新たなものである。

従って、本発明における「DNA 凝縮を目的として（とする）使用」する態様ならびに「DNA 凝縮剤」としての使用態様には、以上説明された本発明のフラーレン誘導体の有する DNA の凝縮能力を利用したあらゆる使用形態が含まれ、例えば DNA 凝縮試薬として  
20 の使用；ベクターの細胞内への導入のための使用；アンチセンス DNA（またはその誘導体）やデコイ DNA（またはその誘導体）等の DNA（またはその誘導体）断片の細胞内への導入のための使用；プロモーターやエンハンサー領域等への結合に基づく遺伝子の発現制御のための使用；二重鎖 DNA から一重鎖 DNA への転換を  
25 抑制することによる細胞周期調節のための使用；一重鎖 DNA から

二重鎖DNAへの、もしくは、二重鎖DNAから一重鎖DNAへの  
メルティングポイントを調節することによるPCRの効率の調節の  
ための使用；等の態様が含まれ、遺伝子治療への応用も可能である。

- フラーレン誘導体の以上の各態様での使用にあたっては、各使用  
5 態様での常法に従い、本発明のフラーレン誘導体またはその塩類を、  
単独または組成物の形で用いることで、所期の目的を達成できる。

#### 実施例



#### 製造例 1

- 10 ジエノン 6 (130mg, 143  $\mu$ mol) のクロロベンゼン (130mL) 中溶  
液に、ジイソブチルアルミニウムハイドライド (in hexane) (  
0.95M, 751  $\mu$ L) を常温にてゆっくり加える。2時間攪拌後、30  
%ポタシウムソジウムタータレート水溶液を加え、混合物を1時間  
攪拌する。水による抽出処理により粗生成物を溶解性の低い黒色塊  
15 (130mg) を得る。このようにして得られるジオール7は、C2対  
称性ならびにC1対称性ジアステレオマーの混合物である(約7  
: 3)。この混合物は、さらなる精製を行うことなく、以下の反応  
に用いられる。

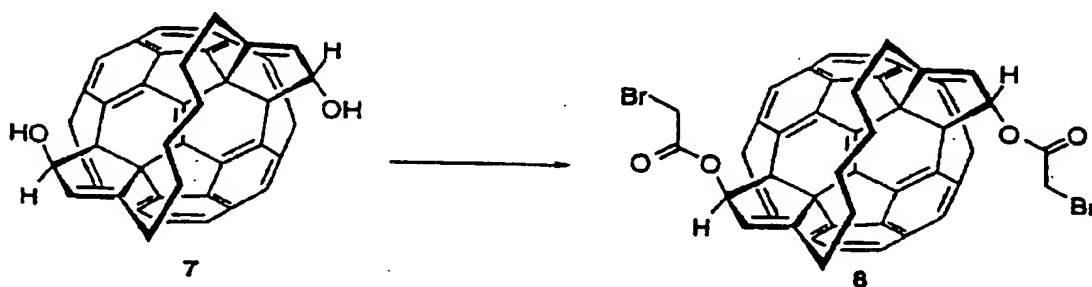
ジオール7：

- 20  $R_f=0.15$  (PhCl)

IR (KBr) 3417, 2925, 1506, 798, 694  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CS<sub>2</sub>1/1) δ 1.54-1.62 (br m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.76-1.88 (br m, 2H, homoallylic methylene proton), 1.88-1.99 (br m, 2H, homoallylic methylene proton), 2.28 (d, 2H, J=12.0 Hz, OH), 2.65-2.80 (m, 4H, allylic methylene proton), 6.22 (br s, 2H, vinyl proton), 6.34 (br d, 2H, J=12.0 Hz, allylic methylene proton)

## 製造例 2



ジオール 7 (50mg, 54.7 μmol) のクロロベンゼン (50 mL) 中溶液にブromoアセチル ブロミド (23.7 μL, 274 μmol) とピリジン (22.1 μL, 274 μmol) を加える。6 時間攪拌後、炭酸水素ナトリウムを加えて反応を終了させる。水で抽出処理をして、粗生成物を得る。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 5 g, クロロベンゼンにて溶出) にて精製して、ジブロミド 8 (31.6 mg, 50 %, 2 steps) を得る。

ジブロミド 8 :

R<sub>f</sub>=0.65 (PhCl)

IR (KBr) 2925, 2854, 1733, 1261, 694 cm<sup>-1</sup>

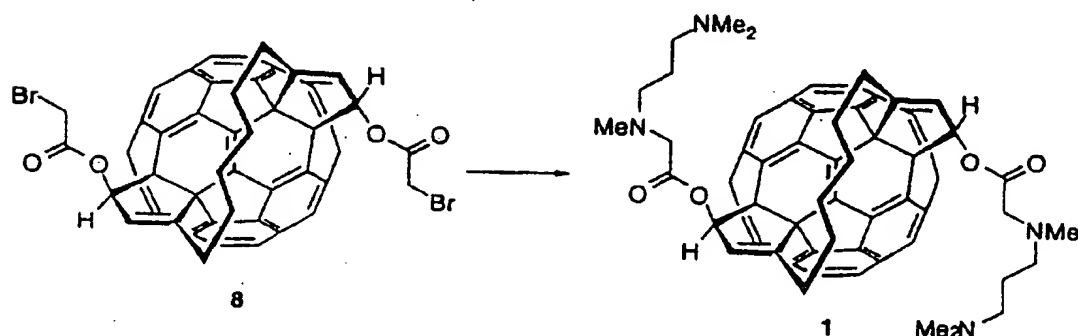
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.55-1.63 (br m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.80-2.00 (br m, 4H, homoallylic methylene



proton), 2.70-2.84 (br m, 4H, allylic methylene proton),  
 3.80 (d, 2H,  $J=12.0$  Hz,  $\text{BrCH}_2\text{CO}$ ), 3.84 (d, 2H,  $J=12.0$  Hz,  
 $\text{BrCH}_2\text{CO}$ ), 6.16 (br s, 2H, vinyl proton), 7.33 (br s, 2H,  
 allylic methylene proton)

5  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25.66 ( $\text{CH}_2$ ), 27.03 ( $\text{CH}_2$ ), 29.33 ( $\text{CH}_2$ ),  
 73.11 ( $\text{sp}^3$ , C60), 74.11 ( $\text{sp}^3$ , C60), 88.04 (allylic CH),  
 125.05 (vinyl CH), 127.24, 132.98, 136.38, 136.52, 138.30,  
 139.56, 141.79, 141.93, 142.07, 142.11, 143.14, 144.74,  
 144.76, 144.90, 145.32, 145.41, 145.62, 145.67, 146.01,  
 10 146.05, 146.35, 147.36, 147.61, 147.83, 148.34, 148.74,  
 148.98, 149.87, 152.51, 166.78 ( $\text{C}=\text{O}$ )

#### 実施例 1



ジブロミド 8 (23.1 mg, 20.0  $\mu\text{mol}$ ) のクロロベンゼン (10 mL) 中  
 15 溶液に、N, N, N'-トリメチル-1, 3-プロパンジアミン (14.7  
 $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{mol}$ ) を加える。1 時間攪拌後、水による抽出処理により  
 粗生成物を得る。ゲル透過クロマトグラフィー (JAIGEL-1H 20x600 mm  
 and -2H 20x600 mm GPC columns, 0.5 % トリエチルアミン/クロロ  
 ホルムにより溶出) により精製してテトラアミン 1 (12.2 mg, 50 %)

を得る。

テトラアミン 1 :

$R_f=0.05$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  85/10/5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.40-1.54 (overlapped m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$   
5 and  $(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_2$ ), 1.50-1.75 (br m, 2H, homoallylic  
methylene proton), 1.75-2.00 (br m, 2H, homoallylic  
methylene proton), 2.08 (overlapped s, 16H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$  and  
 $\text{NCH}_2$ ), 2.20 (s, 6H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.36 (t, 4H,  $J=7.4$  Hz,  $\text{NCH}_2$ ),  
2.60-2.74 (br m, 4H, allylic methylene proton), 3.15 (d,  
10 2H,  $J=17.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 3.28 (d, 2H,  $J=17.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ),  
6.08 (br s, 2H, vinyl proton), 7.35 (br s, 2H, allylic  
methylene proton)  
 $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25.53 ( $\text{CH}_2$ ), 25.96 ( $\text{CH}_2$ ), 26.91 ( $\text{CH}_2$ ),  
29.29 ( $\text{CH}_2$ ), 42.09 ( $\text{NCH}_3$ ), 45.55 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 54.63 ( $\text{CH}_2$ ),  
15 57.55 ( $\text{CH}_2$ ), 58.30 ( $\text{CH}_2$ ), 73.28 ( $\text{sp}^3$ , C60), 74.08 ( $\text{sp}^3$ ,  
C60), 86.68 (allylic CH), 125.86 (vinyl CH), 127.24,  
132.76, 136.34, 136.40, 138.19, 139.49, 141.80, 141.83,  
141.86, 142.08, 143.17, 144.65, 144.73, 144.97, 145.20,  
145.44, 145.46, 145.65, 145.96, 145.99, 146.29, 147.52,  
20 147.82, 148.71, 148.91, 148.96, 150.23, 151.21, 155.30,  
170.68 ( $\text{C}=\text{O}$ )

#### 図面の簡単な説明

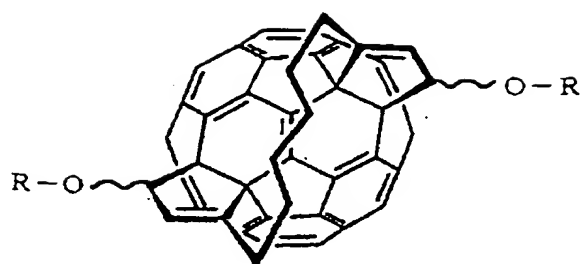
第 1 図は、「テトラアミン化合物」をアガロースゲル電気泳動実  
25 験に付した際の実験結果を示す。

縦軸は、I O D (%) を示し、横軸は、DNA のベースペア数と「テトラアミン化合物」の分子数の比を示す。

## 請 求 の 範 囲

1. DNA凝縮を目的として使用される、1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類。
- 5 2. 含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなる基を1または2個その置換分として有し、フラーレン上に存在する2ないし8個の内の1または2個の $sp^3$ 炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」（但し、2以上の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい）である請求の範囲第1項に記載のDNA凝縮を目的として使用されるフラーレン誘導体またはその塩類。
- 10 3. 含窒素親水性側鎖を、1または2本有する、請求の範囲第2項に記載のDNA凝縮を目的として使用されるフラーレン誘導体またはその塩類。
- 15 4. 含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の炭素数2ないし20個からなる基を1または2個その置換分として有し、フラーレン上に存在する2ないし8個の内の2個の $sp^3$ 炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」（但し、2本の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい）である請求の範囲第3項に記載のDNA凝縮を目的として使用されるフラーレン誘導体またはその塩類。
- 20 5. 1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類の、DNA凝縮を目的とする使用。
- 25

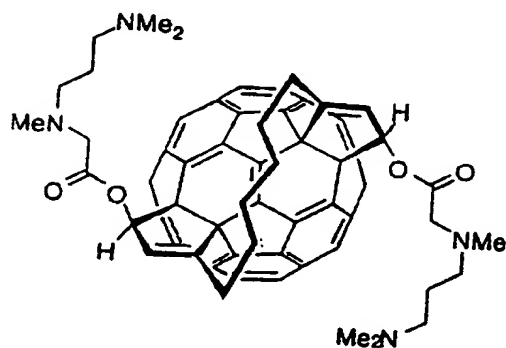
6. 請求の範囲第5項において、含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなる基を1または2個その置換分として有し、フラーレン上に存在する2ないし8個の内の1または2個の $sp^3$ 炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」(但し、2以上の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい)であるフラーレン誘導体またはその塩類の、DNA凝縮を目的とする使用。
7. 請求の範囲第6項において、含窒素親水性側鎖を、1または2本有する、フラーレン誘導体またはその塩類の、DNA凝縮を目的とする使用。
8. 請求の範囲第7項において、含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の炭素数2ないし20個からなる基を1または2個その置換分として有し、フラーレン上に存在する2ないし8個の内の2個の $sp^3$ 炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」(但し、2本の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい)であるフラーレン誘導体またはその塩類の、DNA凝縮を目的とする使用。
9. 1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類により形成されるDNA凝縮体。
10. DNAのベースペア数とフラーレン誘導体またはその塩類の分子数の比が、4:1から1:2である請求の範囲第9項に記載のDNA凝縮体。
11. 以下の一般式:



〔式中、2つのRは、同一または異なって、窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアシル基または水素をそれぞれ意味する  
5 （但し、2つのRは同時には水素ではない）〕

で示されるフラーレン誘導体またはその塩類。

但し、以下の構造式で示されるフラーレン誘導体を除く。

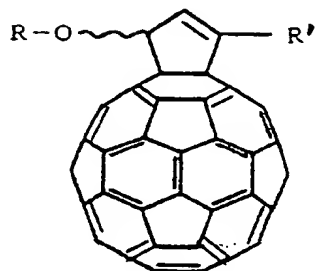


12. 2つのRが、同一または異なって、窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし20個からなるアシル基である請求の範囲第11項に記載のフラーレン誘導体またはその塩類。

13. 2つのRが、同一または異なって、〔N-(N, N-ジ(低

級) アルキルアミノ) (低級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (低級) アルカノイル基である請求の範囲第12項に記載のフラーレン誘導体またはその塩類。

14. 以下の一般式:

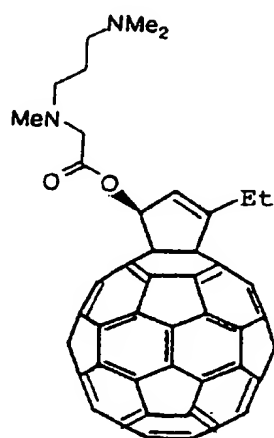


5

[式中、Rは、窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアシル基、および、R'は水素または低級アルキル基をそれぞれ意味する]

10 示されるフラーレン誘導体またはその塩類。

但し、以下の構造式で示されるフラーレン誘導体を除く。



15. Rが、窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、

直鎖状または分枝鎖状の、炭素数 2 ないし 20 個からなるアシル基である請求の範囲第 14 項に記載のフラレン誘導体またはその塩類。

16. R が、[N- (N, N-ジ (低級) アルキルアミノ) (低級) アルキル-N- (低級) アルキル] アミノ (低級) アルカノイル基である請求の範囲第 15 項に記載のフラレン誘導体またはその塩類。

17. 1 ないし 4 本の、含窒素親水性側鎖を有するフラレン誘導体またはその塩類からなる DNA 凝縮剤。

18. 含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を 1 ないし 10 個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数 2 ないし 30 個からなる基を 1 または 2 個その置換分として有し、フラレン上に存在する 2 ないし 8 個の内の 1 または 2 個の  $sp^3$  炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」 (但し、2 以上の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい) である請求の範囲第 17 項に記載のフラレン誘導体またはその塩類からなる DNA 凝縮剤。

19. 含窒素親水性側鎖を、1 または 2 本有する、請求の範囲第 18 項に記載のフラレン誘導体またはその塩類からなる DNA 凝縮剤。

20. 含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を 2 ないし 8 個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の炭素数 2 ないし 20 個からなる基を 1 または 2 個その置換分として有し、フラレン上に存在する 2 ないし 8 個の内の 2 個の  $sp^3$  炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」 (但し、2 本の含窒素親水性側鎖間をつな



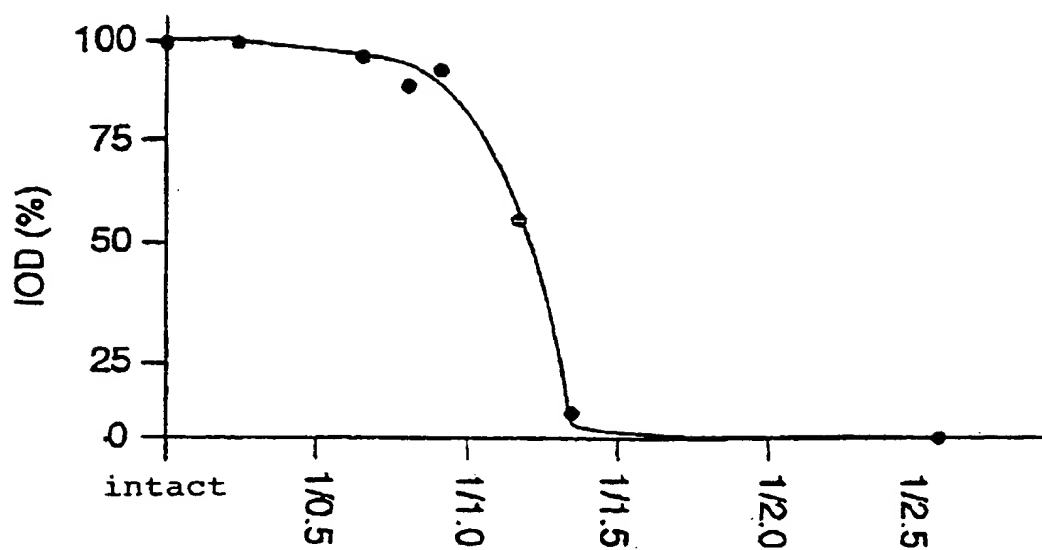
ぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい)である請求の範囲第19項に記載のフラーレン誘導体またはその塩類からなるDNA凝縮剤。

21. 1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類の、DNA凝縮剤の製造を目的とする使用。



1/1

第 1 図



DNAのベースペア数 / 「テトラアミン化合物」の分子数



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01146

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C07C229/16, C12N15/00, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C07C229/16, C12N15/00, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO, 95/19949, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 27 July, 1995 (27. 07. 95) & US, 5811460, A	1-4 5-21
X A	FRIEDMAN, Simon. H et al., "Inhibition of the HIV-1 Protease by Fullerene Derivatives: Model Building Studies and Experimental Verification", J. Am. Chem. Soc., 1993, Vol. 115, No. 15, page 6506-6509	1-4 5-21
X A	NAKAMURA, Eiichi et al., "Biological Activity of Water-Soluble Fullerenes. Structural Dependence of DNA Cleavage, Cytotoxicity, and Enzyme Inhibitory Activities Including HIV-Protease Inhibition", Bull. Chem. Soc. Jpn., 1996, Vol. 69, No. 8, page 2143-2151	1-4 5-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
25 May, 1999 (25. 05. 99)Date of mailing of the international search report  
8 June, 1999 (08. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/01146

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C07C229/16, C12N15/00, A61K48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C07C229/16, C12N15/00, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO, 95/19949, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 27. 7月. 1995 (27. 07. 95) & US, 5811460, A	1-4 5-21
X A	FRIEDMAN, Simon. H et al., "Inhibition of the HIV-1 Protease by Fullerene Derivatives: Model Building Studies and Experimental Verification", J. Am. Chem. Soc., 1993, Vol. 115, No. 15, page 6506-6509	1-4 5-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 05. 99

国際調査報告の発送日

08.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 幸司

4H

9450

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	NAKAMURA, Eiichi et al., "Biological Activity of Water-Soluble Fullerenes. Structural Dependence of DNA Cleavage, Cytotoxicity, and Enzyme Inhibitory Activities Including HIV-Protease Inhibition," Bull. Chem. Soc. Jpn., 1996, Vol. 69, No. 8, page 2143-2151	1 - 4 5 - 21